

WALDEMAR OLSZEWSKI, WOJCIECH ROWIŃSKI, KRYSZYNA OLSZEWSKA,  
JERZY BOROWICZ

## ZMIANY BIOCHEMICZNE I ULTRASTRUKTURALNE W WĄTROBIE W CZASIE CHŁODZENIA I POBIERANIA DO PRZESZCZEPIENIA

Z Zespołu Chirurgii Doświadczalnej i Transplantacji CMDiK PAN w Warszawie  
Kierownik: prof. dr J. Nielubowicz  
i z Pracowni Mikroskopii Elektronowej CMDiK PAN w Warszawie  
Kierownik: doc. dr J. Borowicz

*Badano wpływ płynów chłodzących wątrobę przed pobraniem od dawcy do przeszczepienia na hepatocyty i zatoki wątroby. Do badań używano płynu Ringera, płynu o składzie jonowym „wewnątrzkomórkowym”, osocza i krwi o niskim hematokrycie. Nie stwierdzono większego uszkodzenia hepatocytów, zarówno badaniami biochemicznymi jak i elektronomikroskopowymi. Natomiast niezależnie od rodzaju stosowanego do oziębiania płynu, znacznym zmianom ulegały ściany zatok wątroby.*

Wątroba pobierana do przeszczepienia od dawcy ulega znacznemu uszkodzeniu. Powstałe zmiany są następstwem ostrego niedokrwienia wątroby, nagłego obniżenia jej temperatury i mechanicznego wypłukiwania układu naczyniowego płynami o składzie różnym od normalnie znajdującej się tam krwi. Wyrazem zachodzących zmian jest pojawienie się w płynie wypływającym z wątroby w okresie płukania i oziębiania znacznych ilości glukozy, glikogenu, potasu oraz wzrost aktywności transaminaz i dehydrogenazy kwasu mlekowego.

Po oziębieniu wątroby i w czasie dalszej przerwacji w hipotermii zmiany te nie postępują już tak szybko jak w początkowym okresie oziębiania i wypłukiwania krwi. Świadczy to o tym, iż największe uszkodzenie rozwija się w początkowym okresie ciepłego niedokrwienia i chłodzenia. Również sam sposób chłodzenia może mieć zasadniczy wpływ na rodzaj i wielkość zmian. Dlatego wydawałoby się niezbędnym zbadanie, jakie zmiany morfologiczne i biochemiczne zachodzą w sinusoidach wątroby i hepatocytach w okresie początkowego ciepłego niedokrwienia, oziębiania i pobierania wątroby do przeszczepu. Wyciągnięte z takich obserwacji wnioski służyły opracowaniu optymalnej metody wprowadzania wątroby w stan hipotermii oraz jej przerwacji.

W niniejszej pracy chcieliśmy znaleźć odpowiedź na następujące pytania:

1. Jakie substancje biochemiczne, świadczące o uszkodzeniu komórek wątroby pojawiają się w płynie chłodzącym wypływającym z wątroby?
2. Jakie zmiany ultrastrukturalne dokonują się w sinusoidach i komórkach wątroby w okresie chłodzenia?

3. Który z płynów stosowany do chłodzenia wątroby, jak: buforowany roztwór Ringera, płyn elektrolitowy „wewnątrzkomórkowy”, osocze lub krew allogenna powoduje najmniejsze zmiany biochemiczne i morfologiczne?

#### MATERIAŁ I METODA

Badania wykonano na 6 psach i 4 świniami. Z tego badania biochemiczne przeprowadzono u wszystkich psów, natomiast badania ultrastrukturalne u 4 psów i 4 świń.

Zwierzęta usypiano śmiertelną dawką podanego dożylnie Eunarkonu i natychmiast przystępowano do oziębiania wątroby. Umieszczano jedną kaniulę w żyłę wrotnej, drugą w żyłę główną ponad wątrobą. Żyłę główną, poniżej wątroby oraz

Tabela 1

Wzrost zawartości glukozy, potasu, aktywności SGOT i osmolarności w płynie chłodzącym wypływającym z wątroby po 30 min. chłodzenia

Rodzaj płynu chłodzącego	Płyn Ringera		Płyn „wewnątrzkomórkowy”		Osocze		Krew allogenna	
	psa	świni	psa	świni	psa	świni	psa	świni
wątroba								
liczba dośw.	3	1	1	1	1	1	1	1
glukoza mg%	+43 +200 +135	+60	+50	+125	+50	+55	+155	+120
SGOT j	+4 +10 +55	+6	+19	+5	+3	+16	+38	+26
K mEq/l	+0 +6 +2 -1.9	+0.9	-31	-45	+2.2	+3.1	+1.05	+1.1
Osmolarność m Osm/L	+25	+35	+4	-2	+16	+21	+19	+28

wszystkie gałęzie naczyniowe, którymi krew mogłaby dostawać się do wątroby, podwiązywano. Do żyły wrotnej wlewano 1500 ml płynu o temp. 4° pod ciśnieniem ok. 25—30 cm H<sub>2</sub>O. Płyn ten przepływał przez wątrobę, następnie był w całości zbierany do pojemnika, dla wykonania w nim oznaczeń biochemicznych. Jako płynu oziębiającego użyto u 4 zwierząt buforowanego płynu Ringera o pH 7,4, u 2 płynu elektrolitowego o składzie jonowym wewnątrzkomórkowym (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,05 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O 9,7/l, KCl 1,12/l, NaHCO<sub>3</sub> 0,84/l, glukoza 25,0/l, MgSO<sub>4</sub> 7,38/l), u 2 świeżego osocza buforowanego do 7,4 i u 2 krwi allogennej z płynem ACD buforowanej do pH 7,4.

Płyn wypływający z wątroby badano na zawartość glukozy,  $K^+$ ,  $Na^+$ , kwasu mlekowego i pirogronowego, aktywności transaminaz i dehydrogenazy kwasu mlekowego oraz osmolarność.

Po zakończeniu oziębienia, tj. w 30 minucie doświadczenia, pobierano z wątroby wycinki do badania w mikroskopie elektronowym.

Wycinki te utrwalono w 2,5% aldehydzie glutarowym i dodatkowo w 2%  $OsO_4$  w buforze Milleniga o pH 7,4 a następnie po odwodnieniu w alkoholach zatapiano w Epon 812. Ultracienkie skrawki skrawano na ultramikrotomie Reichert Om U2. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 7A przy napięciu przyspieszającym 80 kV na kliszach ORWO EU 2.

## WYNIKI

Badania biochemiczne. Wyniki przedstawiono w tab. 1. W płynie wypływającym z wątroby wzrastał szczególnie poziom potasu, a także glukozy, niezależnie od rodzaju płynu stosowanego do chłodzenia. Jedynie w przypadku płynu „wewnątrzkomórkowego” o bardzo wysokiej zawartości potasu stężenie tego jonu po przejściu przez wątrobę ulegało obniżeniu. Osmolarność wypływającego płynu wzrastała dość wyraźnie, jedynie przy użyciu płynu wewnątrzkomórkowego pozostawała bez zmian. Natomiast wzrost aktywności SGOT był we wszystkich przypadkach bardzo nieznaczny, co świadczyłoby o stosunkowo nieznacznym uszkodzeniu hepatocytów.

Badania w mikroskopie elektronowym. We wszystkich grupach doświadczalnych widywaliśmy zmiany w hepatocytach i w sinusoidach, zarówno wątroby psa jak i świni.

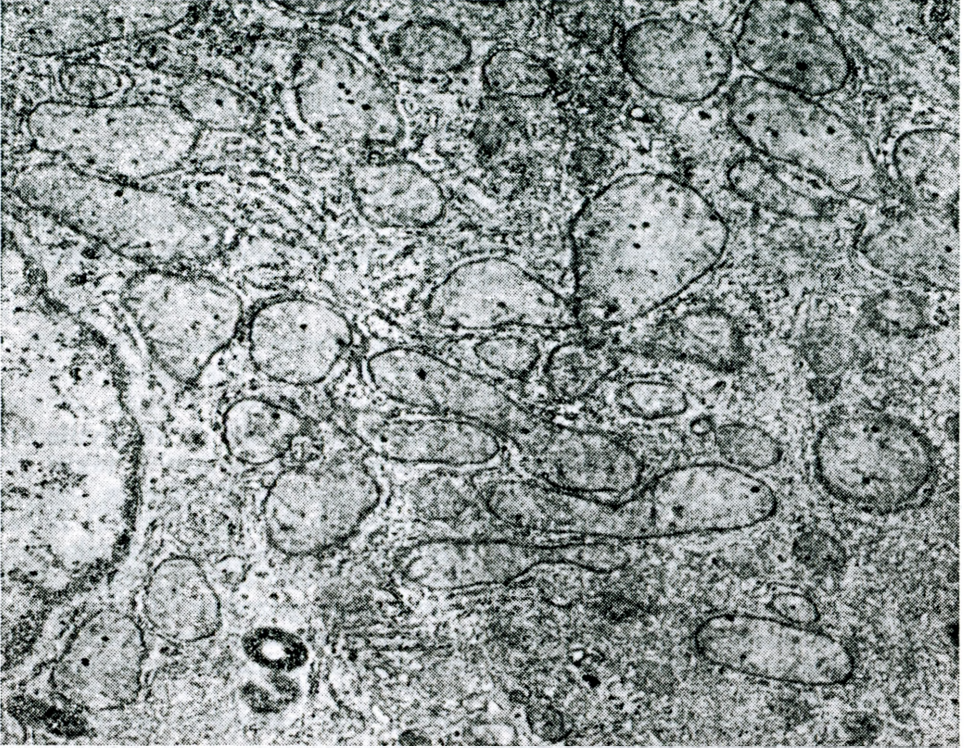
### Hepatocyty

1. Oziębienie płynem Ringera — zmniejszenie ilości retikulum endoplazmatycznego granulowanego ze zwiększeniem agranularnego; mitochondria o nieregularnym obrysie z bardzo małymi grzebieniami i macierzą o nieregularnej gęstości elektronooptycznej; wyraźnie zmniejszona ilość ziarnistości glikogenu (ryc. 1).

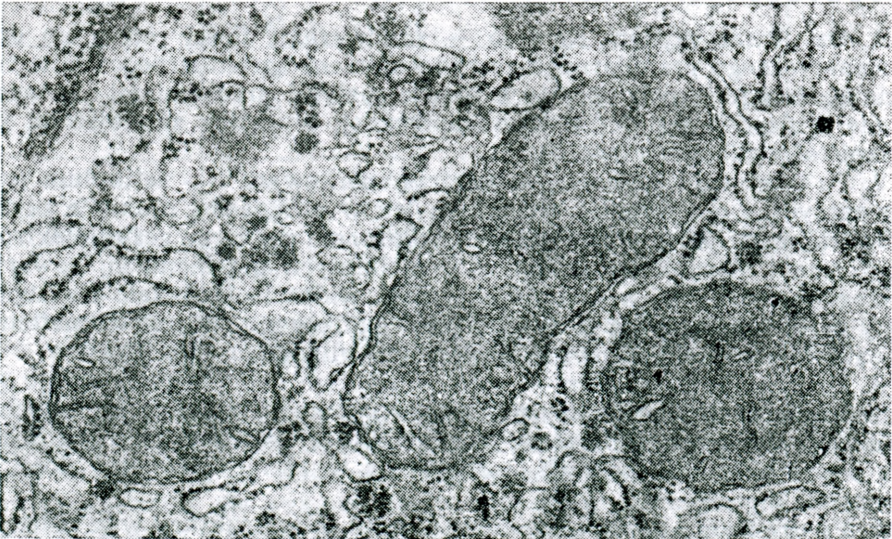
2. Po oziębieniu płynem „wewnątrzkomórkowym” — retikulum endoplazmatyczne o wyglądzie podobnym jak w przypadku płukania płynem Ringera; mitochondria przeważnie wydłużone o macierzy gęstej elektronooptycznie i stosunkowo drobnych i nielicznych grzebieniach; zawartość glikogenu nierówna, w niektórych polach widzenia spotykało się hepatocyty zawierające obfitą ilość ziarnistości glikogenu, w innych natomiast hepatocyty niemal całkowicie pozbawione glikogenu (ryc. 2).

3. Po oziębieniu osoczem — zanik retikulum endoplazmatycznego granulowanego znacznie mniejszy niż w obu poprzednich grupach; mitochondria w zasadzie nie różniące się od prawidłowej wątroby; glikogen obecny we wszystkich hepatocytach, jednakże w wyraźnie mniejszej ilości niż w normie (ryc. 3).

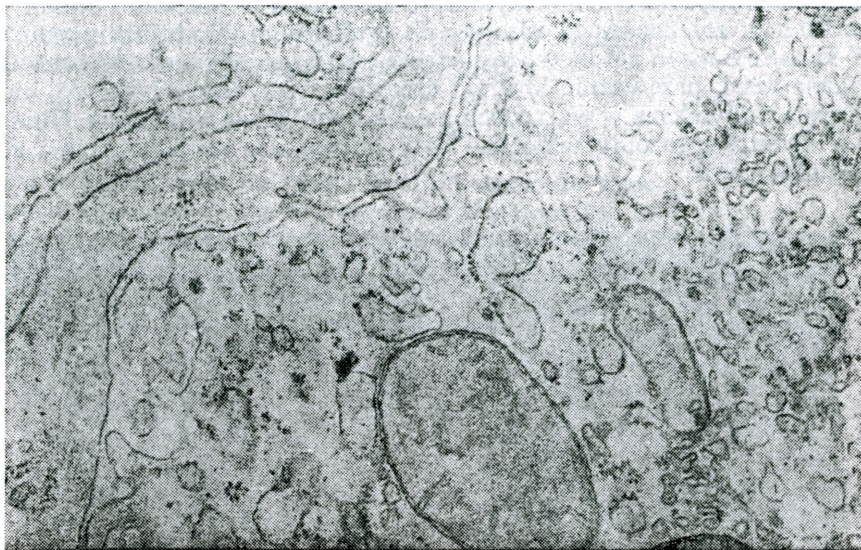
4. Po oziębieniu krwią allogenną — obraz ultrastruktury w zasadzie nie różnił się od normy (ryc. 4). We wszystkich grupach jądra komórkowe nie okazywały żadnych morfologicznie uchwytnych różnic w stosunku do normy.



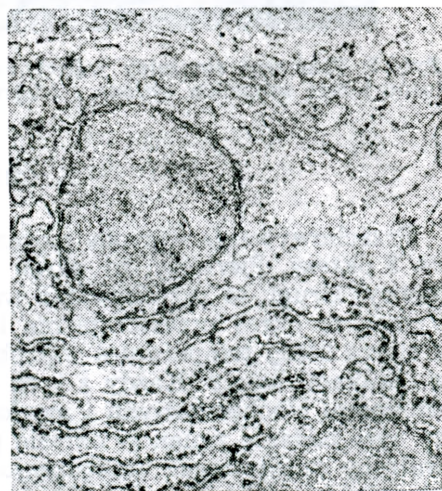
Ryc. 1. Fragmenty hepatocytów — widoczne są mitochondria o nieregularnym obrysie, retikulum endoplazmatyczne o rozdętych kanałach, niewielka ilość glikogenu. Pow. 14 700 $\times$ .



Ryc. 2. Fragment cytoplazmy hepatocyta z wydłużonymi mitochondriami o nieco nieregularnym obrysie, skąpa ilość siatki szorstkiej, przewaga siatki gładkiej o poszerzonych kanałach. Pow. 15 400 $\times$ .



Ryc. 3. Fragment hepatocyta — mitochondria nieznacznie różniące się od prawidłowych (miejscami lekko nieregularny obrys), dobrze wykształcone retikulum endoplazmatyczne. W górnym prawym rogu fragment jądra. Pow. 30 000 $\times$ .



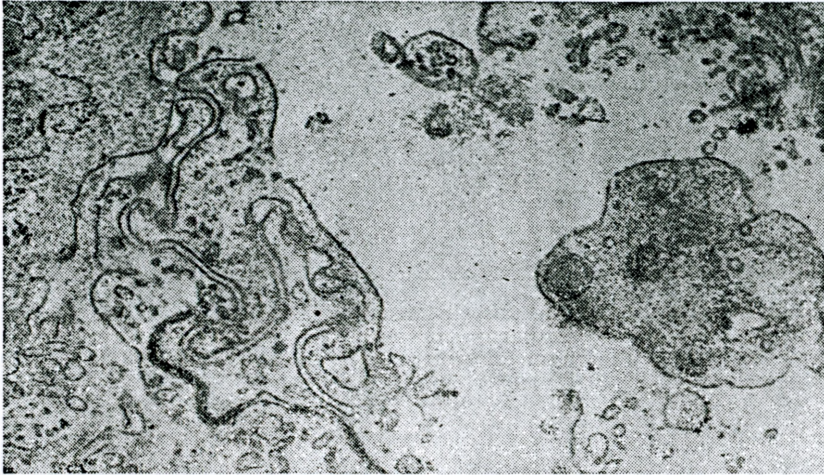
Ryc. 4. Mały fragment cytoplazmy hepatocyta. W otoczeniu dwu widocznych mitochondriów prawidłowo ukształtowane szorstkie retikulum endoplazmatyczne. Pow. 32 000 $\times$ .

### Sinusoidy

We wszystkich grupach doświadczalnych zmiany w sinusoidach były tego samego typu i polegały na: wyraźnym poszerzeniu i rozluźnieniu styków między komórkami wyściełającymi światło sinusoidy, w wielu miejscach braku ciągłości błony komórkowej komórek śródbłonkowych i komórek Browicza-Kupfera z „wysypywaniem” się elementów cytoplazmy tych komórek do światła sinusoidy (ryc. 5). Przestrzenie Dissego poszerzone często zawierały wolno leżące elementy morfotyczne cytoplazmy he-

patocytów jak: ziarnistości glikogenu, pojedyncze mitochondria i struktury lizosomopodobne. Nie stwierdzało się różnic w nasileniu zmian w sinusoidach w zależności od użytego do płukania i chłodzenia płynu.

W świetle naczyń zatokowych widoczne były pojedyncze elementy morfotyczne krwi, przeważnie krwinki czerwone i krwinki płytkowe, których ilość była największa w wątrobach oziębianych krwią allogenną. Nierzadko też w świetle sinusoidy widoczne były pojedyncze mitochondria i ziarnistości glikogenu.



Ryc. 5. Fragment sinusoidy wątrobowej, w świetle widoczny jest trombocyt oraz luźno leżące skupienia złożone z fragmentów struktur komórkowych. Pow. 19 000 $\times$ .

#### OMÓWIENIE

Przechowywanie wątroby możemy podzielić ze względów praktycznych na 3 okresy. Pierwszy, to okres chłodzenia wątroby jeszcze w ustroju dawcy. Drugi, to przechowanie wątroby w temp. 4—6°C poza ustrojem. Trzeci, to okres przeszczepiania i wykonywania zespołów naczyniowych z biorcą kiedy temperatura wątroby stopniowo wzrasta wskutek kontaktu z tkankami biorcy. Każdy z tych okresów charakteryzuje się odrębnymi zmianami biochemicznymi i morfologicznymi. Celem przedstawianej pracy było badanie zmian w okresie pierwszym. Dwa elementy anatomiczne wątroby mogą ulegać uszkodzeniu w tym okresie: hepatocyty oraz śródbłonek i komórki Browicza-Kupfera zatok wątroby. Według danych z literatury elementem najbardziej wrażliwym na niedokrwienie wątroby są hepatocyty.

Po 20 minutach niedokrwienia narządu w normotermii rozwijają się w hepatocytach nieodwracalne zmiany.

Nie ma natomiast w piśmiennictwie danych mówiących o zmianach niedokrwienych w ścianie zatok wątroby — wszystkim zaś przeszczepiającym wątroby wiadomo, że w pierwszych godzinach po przeszczepieniu dominują zaburzenia przepływu przez przeszczepiany narząd. Wskazywałoby to przede wszystkim na istnienie zmian w zatokach.

Wykonane przez nas badania biochemiczne płynu chłodzącego, który przepłynął przez wątrobę, nie wykazały wyraźnego wzrostu aktywności transaminaz. Świadczyłyby to o niewielkim tylko uszkodzeniu hepatocytów. Nie stwierdzono też różnic zależnych od rodzaju płynu używanego do chłodzenia wątroby. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały zmiany w hepatocytach zwłaszcza w ich mitochondriach. Miało to miejsce przy chłodzeniu wątroby płynem Ringera i płynem „wewnątrzwątrobowym”. Całkowicie prawidłowy obraz hepatocytów obserwowano jedynie przy oziębianiu krwią.

Nieoczekiwane były dla nas obrazy elektronomikroskopowe zatok wątroby. Obserwowane tam rozległe uszkodzenia dotyczyły zarówno śródbłonna, jak i komórek Browicz-Kupfera i przestrzeni Dissego. Wielkość zmian nie była zależna do rodzaju płynu chłodzącego. Czy zmiany te były wywołane mechanicznym uszkodzeniem w czasie chłodzenia, czy też chemicznym działaniem płynu chłodzącego, czy też niedokrwieniem śródbłonnów nie można rozstrzygnąć.

Podsumowując, nie stwierdziliśmy zależności między charakterem i rozległością zmian biochemicznych i morfologicznych w hepatocytach i zatokach wątroby a rodzajem płynu chłodzącego. Jedyny wyjątek stanowi tu zupełnie prawidłowy wygląd hepatocytów przy chłodzeniu krwią lub osoczem. Czy któryś ze stosowanych płynów chłodzących ma przewagę nad drugim nie można rozstrzygnąć na podstawie dotychczasowych obserwacji. Niezbędne dla tego celu jest porównanie przeżywalności biorców wątroby — ochładzanej do przeszczepienia używanymi w tej pracy płynami.

#### WNIOSKI

1. Płyny chłodzące wypływające z wątroby przygotowywanej do przeszczepienia, jak roztwór Ringera, płyn „wewnątrzkomórkowy”, osocze i krew, wykazują niską aktywność transaminaz. Świadczy to o niewielkich uszkodzeniach hepatocytów w czasie chłodzenia.

2. W czasie chłodzenia wątroby dochodzi natomiast do znacznego, widocznego w mikroskopie elektronowym, uszkodzenia ściany zatok. Nie zauważono zależności nasilenia zmian od rodzaju stosowanego płynu chłodzącego.

В. Ольшевски, В. Ровиньски, К. Ольшевска, Е. Борович

#### БИОХИМИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССЕ ОХЛАЖДЕНИЯ И ПРИГОТАВЛИВАНИЯ К ТРАНСПЛАНТАЦИИ

#### Содержание

Было исследовано влияние жидкостей охлаждающих печень на гепатоциты и синусы печени перед взятием ее у донора с целью трансплантации. Для исследований использовали жидкость Рингера, жидкость типа „внутриклеточной“, плазму и кровь с низким гематокритом. Не было обнаружено значительного повреждения гепатоцитов ни биохимическими, ни электромикроскопическими исследованиями. С другой стороны, независимо от типа применявшейся для охлаждения жидкости, значительным изменениям подвергались стенки печеночных синусов.

W. Olszewski, W. Rowiński, K. Olszewska, J. Borowicz

BIOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF THE LIVER DURING  
ITS COOLING AND TAKING FOR TRANSPLANTATION

Summary

The effect of fluids cooling the liver before its taking from the donor for transplantation was studied examining the hepatocytes and sinuses of the liver. For investigations Ringer's solution, a fluid of „intracellular” ionic composition, plasma and blood of low haematocrit value were used. No major lesions of hepatocytes were demonstrated during biochemical and electron microscopic examinations. On the other hand, the walls of hepatic sinuses showed significant changes independently of the fluid used for cooling.

Pracę przyjęto do druku: 10 VII 1973

Adres autora: 02006 Warszawa, ul. Nowogrodzka 59.